

PCT WELTORGANISATION FÜR
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHEN
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF



B4

WO 9605821A1

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 31/335, 9/127		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/05821
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Februar 1996 (29.02.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01163		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. August 1995 (18.08.95)			
(30) Prioritätsdaten: P 44 30 593.1 20. August 1994 (20.08.94) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX- DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RESZKA, Regine [DE/DE]; Goethestrasse 23, D-16341 Schwanebeck (DE). BRANDL, Martin [DE/DE]; Kartäuser Strasse 19, D-79102 Freiburg (DE). FICHTNER, Iduna [DE/DE]; Amselstrasse 7, D-13125 Berlin (DE). WARNKE, Gernot [DE/DE]; Freudenstädter Strasse 12, D-79102 Freiburg (DE).			
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(54) Title: LIPOSOME-ENCAPSULATED TAXOL, ITS PREPARATION AND ITS USE			
(54) Bezeichnung: LIPOSOMAL VERKAPSELTES TAXOL, SEINE HERSTELLUNG UND SEINE VERWENDUNG			
(57) Abstract			
<p>The fields of application of the invention are medicine and the pharmaceutical industry. The aim of the invention is to produce liposome-encapsulated taxol with a high taxol concentration and high stability and hence a high therapeutic effect. The invention involves the development of specific forms of taxol encapsulation and the use of these, optionally in combination with other substances, in the treatment of various types of tumour. The liposome-encapsulated taxol is characterized in that it is prepared by high-pressure homogenization or by aerosol formation. An example is the use in combination with liposome-encapsulated carboplatinum in aerosol form in the treatment of lung metastases.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Die Erfindung hat das Ziel, liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil und höherer Stabilität, damit erhöhter therapeutischer Wirksamkeit, zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe besteht darin, spezifische Formen der Verkapselung von Taxol zu entwickeln und diese, ggf. in Kombination mit anderen Substanzen, zur Behandlung unterschiedlicher Tumorarten einzusetzen. Das liposomal verkapselte Taxol ist dadurch gekennzeichnet, daß es durch Hochdruckhomogenisierung bzw. durch Aerosolbildung erzeugt wurde. Ein Beispiel ist die Anwendung in Kombination mit liposomal verkapseltem Carboplatin in Aerosolform gegen Lungenmetastasen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Liposomal verkapseltes Taxol, seine Herstellung und seine Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft liposomal verkapseltes Taxol, seine Herstellung und seine Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Taxol ist ein in der Rinde verschiedener Eibenarten (Taxazeen) vorkommender Naturstoff, der aus diesen Rinden [J. Amer. Chem. Soc., 93:2325 (1971)] bzw. neuerdings auch durch chemische Synthese [J. Amer. Chem. Soc., 1110:5917-5919 (1988)] gewonnen werden kann. Taxol verfügt im Vergleich zu bisher bekannten Zytostatika über einen völlig neuartigen Wirkmechanismus [Ann. NY. Acad. Sci. 466:733-744 (1986); Sartorelli, A. (ed.): Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents. Academic Press, New York, 1981, pp. 483-507]. Die Substanz fördert die Polymerisation der Mikrotubuli aus Tubulindimeren und stabilisiert die Mikrotubuli durch Hemmung ihrer Depolymerisation. Weiterhin kommt es zu einer abnormen Anordnung und Bündelung von Mikrotubuli während des gesamten Zellzykluses, was zur Bildung multipler mikrotubulärer Teilungssterne während der Mitose und damit zur Hemmung der normalen dynamischen Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes führt. Da dadurch die vitale Zellfunktion in der Interphase und während der Mitose entscheidend beeinflusst wird, zeigt Taxol eine deutliche antineoplastische Aktivität gegen verschiedene Tumoren, u.a. gegen implantierte B16-Melanome, P388-Leukämie und gegen humane Mammatumoren.

Die Anwendbarkeit von Taxol ist durch seine geringe Wasserlöslichkeit stark eingeschränkt. Lösungsvermittler wie Cremophor (polyethoxyliertes Castoröl) und Alkohol verbessern die Löslichkeit, führen jedoch bei der Anwendung zu

erheblichen Nebenwirkungen, z.B. zu anaphylaktoiden Reaktionen. Die Verdünnung solcher Lösungen mit physiologischer Kochsalzlösung zur Applikation hat den Nachteil, daß Taxol in physiologischer Kochsalzlösung keine ausreichende Stabilität (maximal 24 Stunden) besitzt. Eine dosislimitierende Nebenwirkung ist die Myelosuppression in erster Linie die Neutropenie [Semin. Oncol. 19:646-662 (1992)]. Liposomen bieten aufgrund ihres amphiphilen Charakters die Möglichkeit sowohl wasser- als auch lipidlösliche Substanzen einzuschließen bzw. zu inkorporieren.

Taxol als eine fast wasserunlösliche Substanz läßt sich mit hoher Effizienz in der Lipidphase von Liposomen geeigneter Zusammensetzung lösen, so daß die durch Cremophor EL beim Menschen beobachteten Toxizitäten einschließlich einer vermehrten Chylomikronenbildung nicht mehr auftreten sollte. Die therapeutische Effektivität von freiem, liposomal verkapseltem und nanopartikulärem Taxol werden an zwei Leukämien, der P388 und der L1210, in vitro verglichen. Während die Wachstumshemmung der P388-Zellen für alle 3 Arzneimittelformen gleich war, zeigte die L1210 eine größere Sensitivität gegenüber der nanopartikulären Form.

Bei Testung aller 3 Zubereitungen an der P388 in vivo (12,5 mg/kg/4 Tage) waren die freie und liposomale Form in ihrer therapeutischen Effektivität vergleichbar, während nanopartikuläres Taxol akute Toxizitäten hervorrief [J. Microencapsul. 7 (2):191-7 (1990)]. In einer weiteren Studie wurde Taxol in freier und liposomaler Form hinsichtlich der Antitumoraktivität an zwei humanen Glioblastomen im Nude-Maus-Modell getestet (12,5 mg/kg/4 Tage). Beide Formen führten zu einer signifikanten Verringerung des Tumorwachstums [In-Vivo 6 (1):23-7 (1992)]. Sharma et al. [Cancer Res. 53:5877-81 (1993)] und Straubinger et al. [J. Natl. Cancer Inst. Monographs 15:69-78 (1993)] berichten von einem signifikanten Antitumoreffekt von liposomalem Taxol (10-45 mg/kg) am murinen Taxol-resistenten Colon-26-Modell. In WO 93/18751 wird die Verkapselung von Taxol in Liposomen und

die Verwendung der erhaltenen Produkte zur Behandlung von Krebserkrankungen beschrieben. Bevorzugt wird eine Kombination dieser Behandlung mit Hyperthermie. Die hergestellten Taxol-Liposomen zeigen eine verbesserte Stabilität.

Bisher wurde ein Patent (WO 93/18751) angemeldet, in dem eine Vielzahl von Taxol-Liposomen-Kombinationen beansprucht wird, von denen insbesondere Vesikel mit positiver Ladung auf der Basis von Cardiolipin, Phosphatidylcholin und Cholesterol hergestellt und untersucht wurden.

Das auf diese Weise verkapselte Taxol mußte jedoch in den Tierversuchen an vier aufeinanderfolgenden Tagen appliziert werden, da eine einmalige Gabe offensichtlich nicht zum gewünschten Antitumoreffekt führte.

Die Erfindung hat das Ziel, liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil und höherer Stabilität, damit erhöhter therapeutischer Wirksamkeit, zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe besteht darin, spezifische Formen der Verkapselung von Taxol zu entwickeln und diese, ggf. in Kombination mit anderen freien bzw. liposomal verkapselten Substanzen, zur Behandlung unterschiedlicher Tumorarten und Lokalisationen einzusetzen. Im Vordergrund steht hierbei neben der möglichst einmaligen Applikation des liposomalen Taxols auch die Verhinderung des dosislimitierenden neutropenischen Effektes des unverkapselten Taxols z.B. durch Kombination mit liposomalem Carboplatin.

Die Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen 1, 13, 14 und 16 gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Die Verkapselung wird erfindungsgemäß mittels Hochdruckhomogenisierung bzw. mittels Aerosolbildung durchgeführt.

Unsere eigenen Experimente umfassen Arbeiten zur Präparation und Charakterisierung verschiedener taxolhaltiger Liposomentypen unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung (vgl. Ansprüche).

Gegenstand der Erfindung ist auch eine pharmazeutische Zubereitung, die das erfindungsgemäße, liposomal verkapselte Taxol und pharmazeutisch übliche Träger- und Zusatzstoffe enthält. Eine praktisch vorteilhaft einsetzbare Mischung enthält 0.98 mg Taxol in 50 mg Phosphatidylcholin (98% der eingesetzten Taxolmenge).

Die liposomale Verkapselung erfolgt durch Hochdruckhomogenisierung oder durch spontane Vesikelbildung. Im ersten Falle wird eine vorgefertigte Liposomen-Mischung in fester bzw. flüssiger Form mit Taxol vereinigt, nachfolgend mehrfach (bevorzugt 2 fach) bei 5-160 MPa homogenisiert und ggf. nachfolgend lyophilisiert.

Das Herstellungsverfahren zur Erzeugung einer Taxol-haltigen liposomalen Zubereitung mittels Hochdruckhomogenisation, sowie ggf. Freisetzung von Liposomen aus einer solchen Zubereitung umfaßt folgende Schritte:

1) Fakultativ Herstellung eines Lipidfilms und Überführung desselben in eine Vormischung bestehend aus Membranbildnern und wäßrigem Medium: Herstellung eines dünnen, trockenen Lipidfilms durch Auflösen des Taxols zusammen mit den Membranbildnern in organischen Lösungsmitteln. Nachfolgend vollständige Entfernung der Lösungsmittel durch Evaporation ggf. durch Sprühtrocknung. Dispergieren des Lipidfilms nach Zugabe von wäßrigem Medium, z.B. durch Schütteln, Rühren, Kneten o.ä. ggf. unter erhöhter Temperatur (ca. 10 °C oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Phospholipide).

2) Hochdruckhomogenisation:

Entweder die aus 1) erhaltene Vormischung oder alternativ ein Gemisch aus Lipid(en), Wasser und Taxol (ggf. grob dispergiert durch Rühren z.B. mittels eines Magnetrührers o.ä.) wird ein- oder mehrmals (jedoch nicht mehr als fünfzigmal) der Hochdruckhomogenisation (z.B. mittels APV Gaulin Micron

Für die tierexperimentelle Prüfung wurden Liposomen nach Beispiel 1 eingesetzt. Es konnte u.a. an einem menschlichen Mamma-Karzinom (MaTu) gezeigt werden, daß diese Liposomenpräparation im Vergleich zum freien Taxol (4 Tage Therapie, je Tag 12,5 mg/kg) bereits nach einmaliger Applikation von 50 mg/kg eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit bei geringerer Hämatoxizität aufwies (Abb. 1+2).

Als Verkapselungsmittel werden verwendet

- a) ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil, wie ein Lipid, ein Tensid oder einen Emulgator,
- b) eine geladene Lipidkomponente und/oder eine gesättigte Lipidkomponente, eine Etherlipidkomponente,
- c) ein Polymer
- d) eine Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzliche Hilfsstoffe, wie z.B. Nanopartikel enthält.

Das Amphiphil hat bevorzugt die in Anspruch 3 angegebene Formel I. Als geladene Lipidkomponente werden bevorzugt eingesetzt: das Anion des Dicethylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, wie Phosphatidylserin oder Phosphatidsäure oder das Anion eines Sphingolipids wie Sulfatid. In einer besonders günstigen Ausführungsform der Erfindung wird als geladene Lipidkomponente Phosphatidylglycerol eingesetzt.

Die Erfindung kann gleichermaßen mit neutralen Lipidkomponenten wie Phosphatidylcholin oder gesättigten Lipidkomponenten wie Dipalmitoylphosphatidylcholin realisiert werden.

Als Polymer dient z.B. Polyethylenglycol vom Molekulargewicht 2000-10000.

Als Trägerflüssigkeit wird im allgemeinen physiologische Kochsalzlösung eingesetzt.

Lab) unter Drucken zwischen 5 und 160 Mpa (50 bis 1600 bar) unterzogen. Edukt, Homogenisator und Produkt werden ggf. temperiert.

3) Fakultativ Gefrier/Tau-Behandlung:

Durch ein- bis mehrmaliges Einfrieren und nachfolgendes Wiederauftauen der Zubereitung während, d.h. zwischen einzelnen Zyklen der Hochdruckhomogenisation oder an deren Ende wird eine homogenere Durchmischung des Ansatzes erreicht und evtl. die vorgebildeten Liposomen vorübergehend destabilisiert, so daß Liposomen mit noch mehr inkorporiertem Taxol gebildet werden.

4) Fakultativ Gefriertrocknen und Redispergieren:

Durch ein- bis mehrmaliges Gefriertrocknen und nachfolgendes Redispergieren der Zubereitungen bevorzugt während, d.h. zwischen einzelnen Zyklen der Hochdruckhomogenisation oder an deren Ende wird eine homogenere Durchmischung des Ansatzes erreicht und die vorgebildeten Liposomen vorübergehend destabilisiert, so daß Liposomen mit noch mehr inkorporiertem Taxol gebildet werden.

5) Fakultativ Überführung der Zubereitung in eine freifließende Liposomendispersion:

Durch schrittweise Zugabe von wäßrigem Medium in Volumenanteilen von 1 bis 30 % des Volumens der Zubereitung und mechanisches Mischen z.B. durch manuelles Schütteln oder mittels eines Vortex-Mischers wird das dreidimensionale Gelgerüst zerlegt und die vorgebildeten Liposomen freigesetzt.

6) Fakultativ Filtration der Liposomendispersion:

Falls die Liposomengröße nach oben hin begrenzt werden soll bzw. eine sterile Zubereitung erhalten werden soll, kann die Liposomendispersion durch Filter mit einer Porenweite von 0,1 μm bis 1 μm filtriert werden.

Die erfindungsgemäße Zubereitung, die Liposomen in dichter Packung enthält (Liposomengel), eignet sich als Wirkstoffdepot, das den Wirkstoff langsam freisetzt und zwar entweder in gelöster Form oder in Form einzelner Wirkstoff-enthaltender Liposomen. Diese Zubereitung kann durch Injektion (z.B. i.m., i.p.) oder Implantation angewendet werden. Aber auch ein Einbringen in Körperhöhlen oder ein Aufbringen auf Schleimhäute, auf die Hornhaut des Auges (Kornea) oder Hautpartien ist möglich. Somit dient die Zubereitung als Träger des Wirkstoffs sowie ggf. zu dessen modifizierter Freigabe.

Die erfindungsgemäße Zubereitung, die Liposomen in freifließender Form enthält, eignet sich als Träger des Wirkstoffs. Diese Zubereitung kann durch Injektion (z.B. i.v., i.m.) oder ebenfalls durch Einbringen in Körperhöhlen oder Aufbringen auf Schleimhäute, auf die Hornhaut des Auges (Kornea) oder Hautpartien angewendet werden. Die erfindungsgemäß verkapselten Liposomen führen zu einer Verteilung des liposomalen Wirkstoffs im Körper, die selektiv eine hohe und lange andauernde Wirkstoffkonzentration am Wirkort bewirkt und damit zu einer Verbesserung der Wirkung oder zu einer Verbesserung des Verhältnisses von Wirkung zu Nebenwirkung.

Zur spontanen Vesikelbildung wird die Taxol/Verkapselungsmittel/Treibgas-Mischung aus Dosieraerosolen versprüht und bildet nach dem Verdampfen des

Treibgases auf der Lungenoberfläche spontan liposomal verkapseltes Taxol. Alternativ können vorgebildete Taxol-Liposomen vernebelt werden.

Dieser Weg ist vor allem dann vorzuziehen, wenn ein direkter Einsatz gegen Lungenmetastasen beabsichtigt ist.

Das liposomal verkapselte Taxol ist als Zytostatikum verwendbar. Diese Verwendung kann allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie Carboplatin oder liposomal verkapseltem Carboplatin erfolgen. Bevorzugt ist der Einsatz gegen Hirntumoren, maligne Melanome, Lebermetastasen, Lungenmetastasen, Mammakarzinome und gegen Urogenitalkarzinome.

Bei der Behandlung u.a. eines menschlichen Mamma-Karzinoms auf der Nude-Maus wurde nach einmaliger Gabe von 50 mg/kg liposomal verkapseltem Taxols, im Vergleich zur behandelten Taxolgruppe (4x12,5 mg/kg) eine signifikante Tumolvolumenhemmung erreicht.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1

Ein Lipidfilm, bestehend aus 1500 mg Eiphsphatidylcholin und 30 mg Taxol, wird in 30 ml steriler, Calcium-freier Phosphat-gepufferter (pH 7,2-7,4) Kochsalzlösung dispergiert.

Die entstandene Dispersion multischichtiger Liposomen wird im Hochdruckhomogenisator (Gaulin Mikrolab 40) bei 700 bar behandelt. Die entstandene Liposomendispersion (SUV) ist bei 4 Grad Celsius kurzzeitig lagerfähig und eignet sich zur parenteralen (i.v.) Applikation.

Zur längeren Lagerung eignet sich die Gelbildung bzw. die Lyophilisierung.

Beispiel 2

Liposomen, hergestellt wie im Beispiel 1 werden mit einem geeigneten Vernebler aerosolisiert (z.B. Aero-Tech II) und somit der inhalativen Applikation zugänglich gemacht.

Beispiel 3

200 mg Taxol, 200 mg Verkapselungsmittel nach Anspruch 2 und 400 µl Ethanol (90%) werden in einen Druckgasbehälter dosiert. Nach Aufbördeln eines Dosierventils (z. B. Perfect Valois DF 10/150 ACT) wird die Zubereitung mit 10 ml druckverflüssigtem Dimethylether versetzt, so daß die klare bis opaleszierende oder leicht getrübe Lösung entsteht.

Beispiel 4

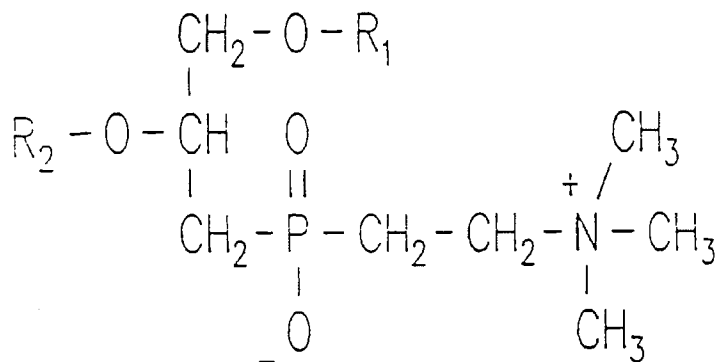
Wie Beispiel 3, jedoch unter Verwendung von druckverflüssigtem Isobutan als Treibgas.

Beispiel 5

Wie Beispiel 3, jedoch unter Verwendung von druckverflüssigtem Propan/Butan (15/85) als Treibgas.

Patentansprüche

1. Liposomal verkapseltes Taxol, dadurch gekennzeichnet, daß es durch Hochdruckhomogenisierung bzw. durch Aerosolbildung erzeugt wurde.
2. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Verkapselungsmittel
 - a) ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil, wie ein Lipid, ein Tensid oder einen Emulgator,
 - b) eine geladene Lipidkomponente und/oder eine gesättigte Lipidkomponente und/oder eine Etherlipidkomponente,
 - c) ein Polymer
 - d) eine Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzliche Hilfsstoffe, wie z.B. Nanopartikel enthält.
3. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil der allgemeinen Formel I,



worin R₁ und R₂ C₁₀ - C₂₀ -Alkanoyl, -Alkenoyl, -Alkyl, -Alkenyl bedeuten, enthält.

4. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente das Anion des Dicethylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, wie Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, oder das Anion eines Sphingolipids, wie Sulfatid enthält.
5. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente ein chemisch modifiziertes Phosphatidylethanolamin enthält, über das Proteine (wie z.B. Antikörper) angekoppelt werden können.
6. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß es als neutrale Lipidkomponente Phosphatidylcholin enthält.
7. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente Phosphatidylserin enthält.
8. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente Phosphatidylglycerol enthält.
9. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß es als gesättigte Lipidkomponenten Dipalmitoylphosphatidylcholin enthält.
10. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß es als gesättigte Lipidkomponenten Dimyrestoylphosphatidylcholin enthält.

11. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-5 dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente Etherlipide enthält.
12. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß in bzw. an der Membran der Vesikel (über chemische Kopplung) Polyethylenglycol (MG 2000-10000) enthält.
13. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine wirksame Menge verkapseltes Taxol nach Anspruch 1-12 und pharmazeutisch übliche Träger- und Zusatzstoffe.
14. Verfahren zur Herstellung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von membranbildenden Amphiphilen, in denen Taxol gelöst wurde, und eine wäßrige Phase, ggf. nach Herstellung eines dünnen, trockenen Lipidfilms, nachfolgender Entfernung der Lösungsmittel durch Evaporation und Dispergieren in Wasser, ein- oder mehrmals, höchstens fünfzigmal, einer Hochdruckhomogenisation mit Drucken von 50 bis 1600 bar (5-160 Mpa) unterzogen wird und ggf. nachfolgend eine Gefrier/Tau-Behandlung, ggf. eine Überführung in eine freifließende Dispersion und anschließend ggf. eine Extrusion durch Filter mit einer Porenweite von 0,1 bis 1 µm erfolgt.
15. Verfahren zur Herstellung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 1-12 durch Aerosolbildung, dadurch gekennzeichnet, daß eine vorgefertigte Liposomen-Mischung in fester bzw. flüssiger Form mit Taxol vereinigt und nachfolgend in speziellen Aerosol-bildenden Vorrichtungen behandelt wird.

- 16 Verfahren zur Herstellung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß Taxol und die Verkapselungsmittel in einem druckverflüssigten Treibgas gelöst vorliegen und nach Verdampfen des Treibgases durch spontane Vesikelbildung auf dem Lungenepithel in liposomal verkapseltes Taxol überführt werden.
17. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 1-12 als Cytostatikum.
18. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 in Kombination mit anderen Wirkstoffen.
19. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 in Kombination mit liposomal verkapseltem Carboplatin.
20. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 in Kombination mit Carboplatin.
21. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Hirntumoren.
22. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen maligne Melanome.
23. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Lebermetastasen.
24. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Lungenmetastasen.

25. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Mammakarzinome.
26. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Urogenitalkarzinome.
27. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol in Kombination mit liposomal verkapseltem Carboplatin in Aerosolform nach Anspruch 19 gegen Lungenmetastasen.

1/2

Abb. 1

Topic: Taxol in SUV
Mammacarcinom MaTu

Animals: Ncr:nu/nu weiblich

Tumor: MaTu s.c.

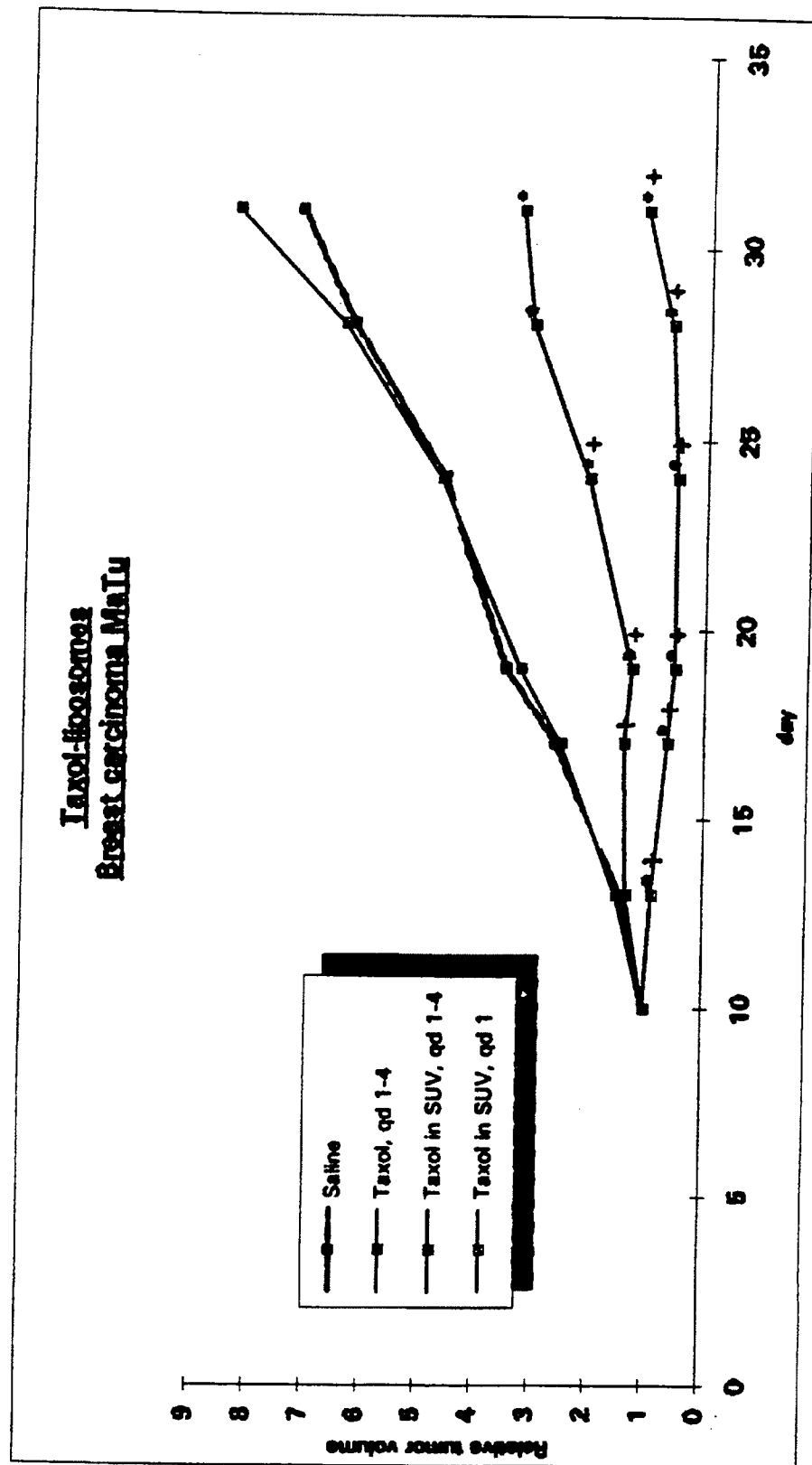
Therapy: i.p.

Group	Nu.mice	Substance	Treatment (d)	Dose (mg/kg/inj.)	Toxic deaths (d)	BWC (%) d10-13	Tumor growth
A	8	Saline	10-13			1	s. Abb.
B	8	Taxol	10-13	12,5	1 (16)	-1	
C	8	Taxol in SUV J918	10-13	12,5	2 (21,32)	1	
D	8	Taxol in SUV	10	50		2	

Comment: Liposomen besser als freies Taxol
Einmalige Behandlung = Therapie an 4 aufeinanderfolgenden Tagen (Depoteffekt?)
gleiches Körpergewicht in allen Gruppen

Abb. 2

2/2



* significant to controls
+ significant to free Taxol

Treatment: i.p.,
qd 1-4, 12,5 mg/kg/d
qd1, 50 mg/kg

ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 95/01163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/335 A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 18751 (GEORGETOWN UNIVERSITY,U.S.A.) 30 September 1993 cited in the application see the whole document ---	1-11,14
A	WO,A,93 25225 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER,U.S.A.) 23 December 1993 see claims 1-11 see page 11, line 23 - line 27 see page 12, line 19 - line 24 --- -/--	1-11,14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December 1995

Date of mailing of the international search report

04.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 95/01163

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 4, 25 July 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 42658, see abstract & PHARM. RES., vol. 11, no. 6, 1994 pages 889-896, A. SHARMA ET AL. 'NOVEL TAXOL FORMULATIONS: PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF TAXOL-CONTAINING LIPOSOMES.'	1-11, 14
P, A	WO, A, 94 26254 (THE LIPOSOME COMPANY INC., U.S.A.) 24 November 1994 see page 4, line 32 - page 5, line 12 see claims	1-11, 14
P, X	US, A, 5 415 869 (R.M. STRAUBINGER ET AL.) 16 May 1995 see column 7, line 12 - line 42 see column 9, line 44 - line 52 see claims	1-4, 6-10, 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 95/01163

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9318751	30-09-93	AU-B- 3922193 CA-A- 2132711 US-A- 5424073	21-10-93 30-09-93 13-06-95
WO-A-9325225	23-12-93	AU-B- 4633893	04-01-94
WO-A-9426254	24-11-94	AU-B- 6833994	12-12-94
US-A-5415869	16-05-95	AU-B- 1176995 CA-A- 2153326 EP-A- 0683664 WO-A- 9513053	29-05-95 18-05-95 29-11-95 18-05-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01163

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/335 A61K9/127

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,93 18751 (GEORGETOWN UNIVERSITY,U.S.A.) 30.September 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11,14
A	WO,A,93 25225 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER,U.S.A.) 23.Dezember 1993 siehe Ansprüche 1-11 siehe Seite 11, Zeile 23 - Zeile 27 siehe Seite 12, Zeile 19 - Zeile 24 --- -/--	1-11,14

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15.Dezember 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04.01.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scarponi, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 4, 25.Juli 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 42658, siehe Zusammenfassung & PHARM. RES., Bd. 11, Nr. 6, 1994 Seiten 889-896, A. SHARMA ET AL. 'NOVEL TAXOL FORMULATIONS:PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF TAXOL-CONTAINING LIPOSOMES.'	1-11,14
P,A	--- WO,A,94 26254 (THE LIPOSOME COMPANY INC.,U.S.A.) 24.November 1994 siehe Seite 4, Zeile 32 - Seite 5, Zeile 12 siehe Ansprüche	1-11,14
P,X	--- US,A,5 415 869 (R.M.STRAUBINGER ET AL.) 16.Mai 1995 siehe Spalte 7, Zeile 12 - Zeile 42 siehe Spalte 9, Zeile 44 - Zeile 52 siehe Ansprüche -----	1-4, 6-10,14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01163

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9318751	30-09-93	AU-B- 3922193 CA-A- 2132711 US-A- 5424073	21-10-93 30-09-93 13-06-95
WO-A-9325225	23-12-93	AU-B- 4633893	04-01-94
WO-A-9426254	24-11-94	AU-B- 6833994	12-12-94
US-A-5415869	16-05-95	AU-B- 1176995 CA-A- 2153326 EP-A- 0683664 WO-A- 9513053	29-05-95 18-05-95 29-11-95 18-05-95